

(19) RÉPUBLIQUE FRANÇAISE
INSTITUT NATIONAL
DE LA PROPRIÉTÉ INDUSTRIELLE
PARIS

(11) N° de publication :
(à n'utiliser que pour les
commandes de reproduction)

2 650 840

(21) N° d'enregistrement national :

89 10802

(51) Int Cl⁸ : C 12 Q 1/68.

(12)

DEMANDE DE BREVET D'INVENTION

A1

(22) Date de dépôt : 11 août 1989.

(30) Priorité :

(43) Date de la mise à disposition du public de la
demande : BOPI « Brevets » n° 7 du 15 février 1991.

(60) Références à d'autres documents nationaux appa-
rentés :

(71) Demandeur(s) : *BERTIN & CIE, Société anonyme.* — FR.

(72) Inventeur(s) : Daniel Cohen ; Frédéric Dufau ; Jean
Hache ; Marc Jeanpierre ; Frédéric Ginot ; Marie-Christine
Martinez ; Brigitte Roussel née Sayagh ; Agnès Troton
née Marcadet.

(73) Titulaire(s) :

(74) Mandataire(s) : Cabinet Ores.

(54) Procédé rapide de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, et ses applications.

(57) Ce procédé est caractérisé en ce que :

(1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à
identifier avec un nucléotide de longueur suffisante;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hy-
bride obtenu en 1, — ledit nucléotide servant d'amorce —, en
présence :

- d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
- d'au moins une base nucléotidique modifiée;

(3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée
par tout moyen approprié.

Application : diagnostic des maladies génétiques.

FR 2 650 840 - A1

1

La présente invention est relative à un procédé de détection et/ou d'identification d'une seule base sur une séquence d'acide nucléique, ainsi qu'à ses applications, notamment dans le diagnostic des maladies génétiques et dans le contrôle d'une hybridation.

L'hybridation d'acide nucléique a été utilisée pour étudier l'identité et établir la présence d'acides nucléiques. L'hybridation est basée sur l'appariement de bases complémentaires. Lorsque des acides nucléiques simple brin complémentaires sont incubés ensemble, lesdits acides nucléiques simple brin s'apparient pour former une molécule hybride double brin. La capacité de l'ADN simple brin ou de l'ARN à former une structure avec une séquence d'acide nucléique complémentaire est utilisée comme méthode d'analyse et de diagnostic. La disponibilité de nucléosides triphosphates radioactifs ayant une activité spécifique importante et le marquage de l'ADN au ^{32}P en présence d'enzymes à fonction polymérase, par exemple la Ta kinase, a permis d'identifier, d'isoler et de caractériser de nombreuses séquences d'acides nucléiques d'intérêt biologique.

L'hybridation représente un critère important dans la détection de la présence de séquence d'acide nucléique particulières comme par exemple :

- dans les maladies génétiques humaines ou animales où une modification héréditaire du patrimoine génétique a des conséquences morbides (par insertion, délétion ou mutation ponctuelle d'une séquence particulière) ;
 - dans les maladies cancéreuses, où des réarrangements de l'ADN génomique sont observés ;
 - au cours des infections où l'on détecte la présence de génomes étrangers tels que celui des microorganismes (bactéries, champignons et virus par exemple) ;
 - pour l'identification des individus en général :
- en médecine légale (paternité, filiation par

2

exemple),

. dans le domaine agroalimentaire (plantes, contrôle sanitaire par exemple).

Cependant, l'hybridation comme outil de diagnostic peut être limitée par la difficulté de sa mise en oeuvre (techniques lourdes) ou par l'absence de spécificité de l'hybridation (protocole opératoire).

En effet, l'étude chimique de l'hybridation a mis en évidence l'influence de la concentration de chacun des brins d'acides nucléiques impliqués, de leurs longueurs, de leurs compositions en bases, de la température, du pH, de la force ionique, de la viscosité du milieu.

La température notamment, est critique et doit rester inférieure à la température de fusion (T_m : température à laquelle 50 % des séquences sont sous forme double brin). En solution, la température optimale d'hybridation est 25°C en dessous de la T_m pour une sonde de 150 nucléotides et légèrement plus basse pour les sondes plus courtes.

Ainsi lorsque l'on veut détecter une mutation portant sur une seule base, on peut généralement utiliser, selon les cas, deux types de sondes : des sondes d'acide nucléique dites longues, supérieures à 150 nucléotides en général, ou des sondes d'acide nucléique dites courtes entre 17 et 24 nucléotides en général. Si la mutation intervient dans un site reconnu spécifiquement par une enzyme dite de restriction, on peut utiliser la technique de Southern : celle-ci comporte les étapes d'isolement de l'ADN, de digestion par l'enzyme de restriction, d'électrophorèse sur gel, de transfert sur une membrane et d'hybridation à l'aide d'une sonde longue intéressant la région de la mutation ; après lavage et autoradiographie, l'analyse des tailles des fragments obtenus permet d'infirmier ou confirmer la présence de la mutation. Le procédé très lourd nécessite que la mutation intéresse un site de restriction. Si ce n'est pas le cas, on peut synthétiser

3

une sonde courte oligonucléotidique de 17 à 24 nucleotides dont le centre coïncide avec la mutation que l'on veut détecter. En choisissant des conditions appropriées d'hybridation et de rinçage (spécifique de chaque système), on ne peut obtenir une hybridation à l'aide de l'oligonucléotide marquée qu'en cas d'homologie parfaite (une seule différence nucléotidique, notamment à l'endroit de la mutation, entraîne la déstabilisation de l'hybridation).

10 Cependant, ces différentes méthodes présentent un certain nombre d'inconvénients:

- conditions de température difficiles à maîtriser, pour obtenir une hybridation appropriée ;
- éventuellement présence obligatoire d'un site
15 de restriction ;
- immobilisation de l'acide nucléique sur membrane (Southern blot).

Le Brevet Américain AMERSHAM n° 4 656 127, a permis de pallier certains de ces inconvénients, notamment
20 en ce qu'il permet de détecter une mutation présente à un endroit ne présentant pas de site de clivage par une enzyme de restriction.

Ce Brevet Américain n° 4 656 127, décrit une méthode de détection de la mutation d'une base nucléotique
25 spécifique dans un fragment d'acide nucléique (ADN ou ARN) cible par :

- (a) hybridation d'une sonde avec la séquence cible pour former un hybride d'acide nucléique, dans lequel une extrémité de la sonde est hybridée de manière adjacente à la
30 base nucléotidique spécifique ;
- (b) mélange de l'hybride avec un dérivé nucléotidique dans des conditions appropriées à l'élongation de la sonde, de manière à permettre la jonction dérivé nucléotidique - extrémité de la sonde, seulement si la base spécifique dans
35 la séquence cible est (ou n'est pas) la mutation à détecter, une sonde associée audit dérivé nucléotidique étant

résistante a une digestion dans des conditions particulières ;

- (c) digestion de l'hybride par une exonucléase dans des conditions telles que le fragment double brin est progressivement digéré à partir de l'extrémité de la sonde à moins que ladite extrémité ait été mise en jonction avec ledit dérivé nucléotidique ;
- (d) élimination des portions de la sonde qui ne sont plus hybridées à la chaîne d'acide nucléique ;
- 10 (e) et détection d'une mutation de la base nucléotidique spécifique dans la séquence cible par détection de la présence ou de l'absence de la sonde après digestion.

Ce procédé implique en particulier en plus de la sonde, l'utilisation d'un dérivé nucléotidique ayant des propriétés particulières et comporte de ce fait encore de nombreuses étapes. De plus, il nécessite, pour sa réalisation, une immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane et également un marquage (de la sonde ou du dérivé nucléotidique).

20 La présente invention s'est en conséquence, donné pour but de pourvoir à un procédé d'identification d'une base nucléotidique spécifique, aisé et rapide à mettre en oeuvre, qui répond mieux aux nécessités de la pratique que les procédés de l'Art antérieur, notamment en

25 ce que le procédé conforme à l'invention ne nécessite pas un protocole opératoire complexe, c'est-à-dire ne nécessite ni immobilisation de l'ADN, ni marquage de la sonde, et s'applique à la détection de séquences d'acide nucléique particulières, notamment dans les maladies génétiques, les

30 maladies cancéreuses, les infections, l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

La présente invention a pour objet un procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :

- 35 (1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à

5

identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit
5 adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;

(2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :

- 10 - d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;

- 15 (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.

On entend par nucléotide, au sens de la présente invention, aussi bien un oligonucléotide, qui comprend
20 de 10 à 50 bases qu'un nucléotide pouvant comprendre plus de cent bases.

Selon un mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, les bases nucléotidiques bloquantes sont des
25 didésoxynucléotides.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques
30 chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, le marqueur est identique ou différent pour
35 chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

Selon une modalité de cette disposition,

6

lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées a l'aide de marqueurs différents, la détection des quatre nucléotides bloquants est avantageusement simultanée.

Selon un autre mode de mise en oeuvre avantageux dudit procédé, lorsque les quatre bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou séparément.

Selon une disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, on détecte, de manière appropriée, le pyrophosphate formé lors de la réaction de polymérisation.

En effet, la réaction de polymérisation génère la production d'un pyrophosphate, comme suit :

matrice - amorce + dNTP ----> matrice - (amorce + dNMP) + PPi.

En mesurant le pyrophosphate dans chaque tube de réaction, il est possible de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite.

Selon une autre disposition avantageuse de ce mode de mise en oeuvre, on détecte chaque base nucléotidique marquée.

En effet, chaque tube de réaction contient, en ce cas, une seule base nucléotidique marquée, les trois autres ne l'étant pas ; la mesure de la base marquée (par fluorescence, radioactivité...) permet de déterminer pour laquelle des bases une réaction de polymérisation s'est produite, les bases marquées non incorporées étant éliminées par lavage.

Le procédé conforme à l'invention a notamment l'avantage de permettre de définir les conditions opératoires, indépendamment de la base nucléotidique à identifier et de ne pas nécessiter d'immobilisation de l'acide nucléique sur une membrane.

La présente invention a également pour objet un kit ou coffret de diagnostic, prêt à l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé conforme à l'invention, caractérisé en

7

ce qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide (servant d'amorce) capable de s'hybrider avec la séquence cible de manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter ;
- des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques modifiées de manière à être incorporables dans le produit d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit produit d'extension ; et
- des quantités appropriées d'une polymérase sans action exonucléase 3'5'.

Selon un mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides (ddTTP, ddGTP, ddATP, ddCTP).

Selon un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée notamment par un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

Selon encore un autre mode de réalisation avantageux dudit kit ou coffret, il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

Outre les dispositions qui précèdent, l'invention comprend encore d'autres dispositions, qui ressortiront de la description qui va suivre.

L'invention sera mieux comprise à l'aide du complément de description qui va suivre, qui se réfère à des exemples de mise en oeuvre du procédé objet de la présente invention.

Il doit être bien entendu, toutefois, que ces exemples sont donnés uniquement à titre d'illustration de l'objet de l'invention, dont ils ne constituent en aucune manière une limitation.

8

Exemple 1 : diagnostic de la drépanocytose par le procédé conforme à l'invention (mesure des didésoxynucléotides fluorescents).

La drépanocytose ou anémie falciforme est due à une mutation dans l'un des exons du gène β codant pour la chaîne β de l'hémoglobine (Hb). Cette mutation consistant en une substitution d'une adénine (A) par une thymine (T), modifie le codon GAG, traduit en un acide glutamique (en position G) dans l'Hb normale, en codon GTG, traduit en une valine dans l'Hb anormale (HbS).

L'ADN qui a été utilisé dans cet exemple correspond à une séquence d'ADN amplifié simple-brin.

a) Blocage des amorces d'amplification.

- * mélanger dans un tube de microcentrifugation, pour chaque ADN matrice :
- 100 ng d'ADN (simple-brin amplifié)
- 7 μ l de tampon Sequenase 5X (= Tris-HCl pH 7,5, 200 mM ; NaCl, 250 mM ; MgCl₂, 100 mM)
- H₂O qsp 22 μ l
- * agiter à l'aide d'un vortex et centrifuger rapidement
- * incuber au bain-marie à 95°C pendant 2 minutes.
- * enlever vite et placer au bain-marie à 37°C pendant 10 minutes.
- * préparer le tampon de réaction pour un échantillon d'ADN, constitué de :
- 2,5 μ l DTT 0,1 M
- 1 μ l d'un mélange de ddNTP, dilué au 1/400 (ddTTP : 112 μ M ; ddGTP : 1,12 μ M ; ddATP : 3,36 μ M ; ddCTP : 8,96 μ M) ; et
- H₂O qsp 6,5 μ l
- Sequénase 1 μ l (3 unités)
- * enlever les tubes du bain-marie et centrifuger rapidement,
- * ajouter le tampon de réaction et mélanger,
- * placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 minutes,
- * enlever les tubes et les placer dans la glace.

9

b) Elimination des didésoxynucléotides froids en excès

On utilise les systèmes de microséparation Centricon 3 ou 10 (Amicon) qui, par filtration sur membrane accélérée par centrifugation, permettent de retenir des espèces moléculaires de poids moléculaire supérieur à 3 000 ou 10 000 Daltons (par exemple: un nucléotide correspond à 330 D et un oligonucléotide de synthèse de 20 méres correspond à 6 600 D).

- disposer le volume réactionnel issu de a) dans un "Centricon" 3 ou 10 et diluer si nécessaire,
- centrifuger à moins de 5 000 g en suivant les instructions du fabricant, de façon à récupérer un volume minimal,
- inverser le système "Centricon",
- centrifuger pour récupérer le volume réactionnel,
- ramener le volume obtenu à 12 µl.

c) Microséquençage (procédé conforme à l'invention)

* Pour chaque tube d'ADN, ajouter aux 12 µl :

- 15 ng d'oligonucléotide 5' CATGGTGACCTGACTCCTG 3' (OA), correspondant à la séquence s'arrêtant à la base adjacente à la position de la mutation

- 7 µl de Tampon Séquenase 5X tel que défini en a) ci-dessus et procéder comme dans a) ; puis

* préparer le tampon de réaction constitué pour chaque échantillon de :

- 2,5 µl DTT 0,1 M
- 1 µl d'une dilution au 1/400ème d'un mélange de ddNTP fluorescents (ddTTP* : 112µM ; ddGTP* : 1,12µM ; ddATP* : 3,36µM ; ddCTP* : 8,96µM). Les didésoxynucléotides fluorescents sont vendus par Du Pont (Genesis™ 2000 DNA Analysis System) ;
- H₂O qsp 6,5 µl
- Séquenase 1µl (3 unités)
- * enlever les tubes du bain-marie, centrifuger rapidement,
- * ajouter le tampon de réaction, mélanger,
- * placer au bain-marie à 37°C, pendant 5 mns,
- * enlever les tubes et placer les dans la glace.

10

d) Lavage des didésoxynucléotides fluorescents en excès:

* passer les échantillons sur colonne de Sephadex G50.

* récupérer les éluats.

e) Détection

La détection se fait pour chaque échantillon après migration électrophorétique et excitation par une source telle qu'un laser. Le signal est analysé par un fluoromètre.

On obtient les courbes a (témoin) et b (malade), comme visible sur la figure 1, qui permet de détecter au niveau de la position correspondant à une éventuelle mutation, l'incorporation d'un ddATP en a, pour l'individu sain et pour l'individu malade homozygote en b, l'incorporation d'un ddTTP.

13 Exemple 2 : Microséquencage d'une base sur une séquence d'acide nucléique (ADN du bacteriophage M13 mp8).

a) Matériel de départ

* ADN simple brin de bacteriophage M13mp8

20 * Oligonucléotide de synthèse dit Primer Universel de séquence : 3'TGACCGGCAGCAAAATG5'

La première base incorporée sur l'amorce dans le sens 5'-->3' est un G.

b) Protocole

25 Le protocole est équivalent au protocole de détection de mutation ponctuelle à partir de l'étape c de l'exemple 1. Les étapes a et b sont inutiles, l' ADN du phage M13 étant non contaminé par des oligonucléotides.

En variante, le protocole est le suivant :

- 30 - 3 µg d' A.D.N. simple-brin M13
- 15 ng d'oligonucléotide primer universel
- 7 µl de Tampon 5X Sequenase
- H₂O qsp 22 µl

35 La détection révèle l'incorporation sur le primer d'un dideoxy GTP, ce qui correspond au résultat attendu, comme visible sur la figure 2, qui montre les résultats obtenus avec deux dilutions différentes des ddNTP

11

(1/200 (a) et 1/400eme (b)).

Ainsi que cela ressort de ce qui précède, l'invention ne se limite nullement a ceux de ses modes de mises en oeuvres, de réalisation et d'application qui viennent d'être décrits de façon plus explicite ; elle en embrasse au contraire toutes les variantes qui peuvent venir à l'esprit du technicien en la matière, sans s'écarter du cadre, ni de la portée de la présente invention.

12
REVENDEICATIONS

- 1') Procédé de détection et/ou d'identification d'une base nucléotidique spécifique présente sur une séquence d'acide nucléique, caractérisé en ce que :
- 5 (1) on hybride la séquence sur laquelle se trouve la base à identifier avec un nucléotide de longueur suffisante pour permettre une hybridation correcte, quelle que soit la température de réaction, ledit nucléotide s'hybridant avec la séquence cible, de manière à ce que son extrémité 3' soit
- 10 adjacente à la base nucléotidique spécifique à détecter et/ou à identifier ;
- (2) on débute la synthèse du brin complémentaire de l'hybride obtenu en (1), - ledit nucléotide servant d'amorce -, en présence :
- 15 - d'une polymérase sans action exonucléase 3'5' et
- d'au moins une base nucléotidique modifiée, de manière à être incorporable dans le produit d'extension de l'amorce, ladite incorporation bloquant l'élongation dudit produit d'extension ;
- 20 (3) on détecte la base nucléotidique bloquante incorporée par tout moyen approprié, ladite détection permettant d'identifier la base nucléotidique spécifique complémentaire présente sur la séquence cible à analyser.
- 2') Procédé selon la revendication 1, caracté-
- 25 risé en ce que les bases nucléotidiques bloquantes sont des didésoxynucléotides.
- 3') Procédé selon la revendication 1 ou la revendication 2, caractérisé en ce que lesdites bases nucléotidiques bloquantes sont marquées de manière appropriée,
- 30 notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.
- 4') Procédé selon la revendication 3, caracté-
- 35 risé en ce que le marqueur est identique ou différent pour chacune des bases nucléotidiques bloquantes.

13

5) Procédé selon la revendication 4, caracté-
risé en ce que lorsque les quatre bases bloquantes sont
marquées à l'aide de marqueurs différents, la détection des
quatre nucléotides bloquants est avantageusement simulta-
5 née.

6') Procédé selon l'une quelconque des revendi-
cations 1 à 4, caractérisé en ce que lorsque les quatre
bases bloquantes sont marquées de manière identique ou bien
lorsqu'elles ne sont pas marquées, la détection des quatre
10 nucléotides bloquants est réalisée successivement et/ou sé-
parément.

7') Procédé selon la revendication 6, caracté-
risé en ce qu'on dose, de manière appropriée, le pyrophos-
phate formé lors de la réaction de polymérisation, ledit
15 dosage de pyrophosphate permettant de déterminer pour la-
quelle des bases une réaction de polymérisation s'est pro-
duite.

8') Procédé selon la revendication 6, caracté-
risé en ce qu'on détecte chaque base nucléotidique blo-
20 quante marquée.

9') Kit ou coffret de diagnostic, prêt à
l'emploi, pour la mise en oeuvre du procédé selon l'une
quelconque des revendications 1 à 8, caractérisé en ce
qu'il comprend outre les quantités convenables de réactifs
25 et tampons adaptés à la mise en oeuvre du procédé :

- des quantités appropriées d'un nucléotide, servant
d'amorce, capable de s'hybrider avec la séquence cible de
manière à ce que son extrémité 3' soit adjacente à la base
nucléotidique spécifique à détecter ;
- 30 - des quantités appropriées de quatre bases nucléotidiques
modifiées, de manière à être incorporables dans le produit
d'extension de l'amorce tout en bloquant l'élongation dudit
produit d'extension ; et
- des quantités appropriées d'une polymérase sans action
35 exonucléase 3'5'.

10') Kit ou coffret selon la revendication 9,

14

caractérisé en ce que les bases nucleotidiques modifiées sont des didésoxynucléotides.

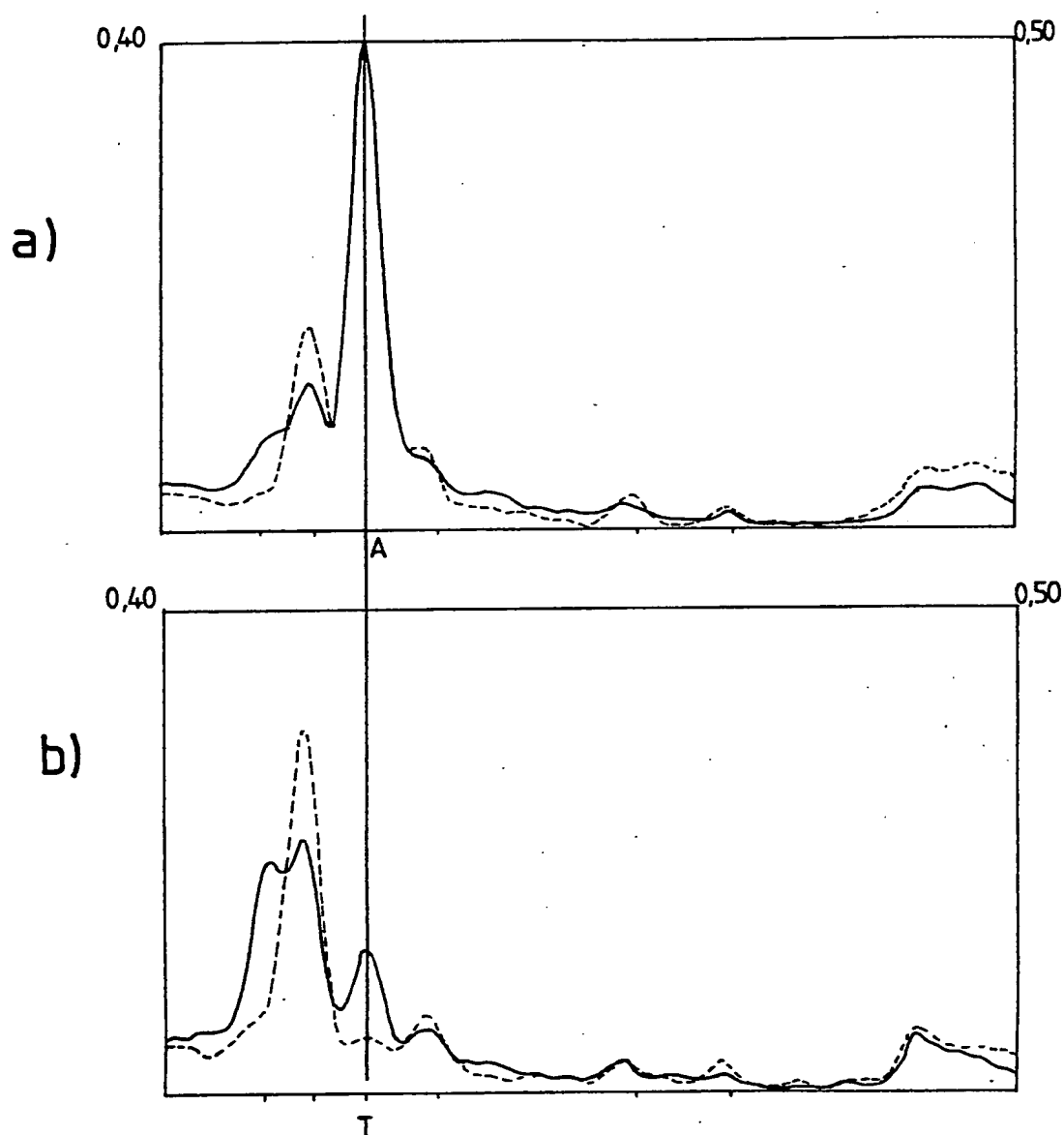
11) Kit ou coffret selon la revendication 9 ou la revendication 10, caractérisé en ce que les bases nucléotidiques modifiées sont marquées de manière appropriée, notamment à l'aide d'un marqueur choisi dans le groupe qui comprend des substances radioactives, des enzymes, des produits chimiques chromophores fluorescents ou chimioluminescents et des anticorps appropriés.

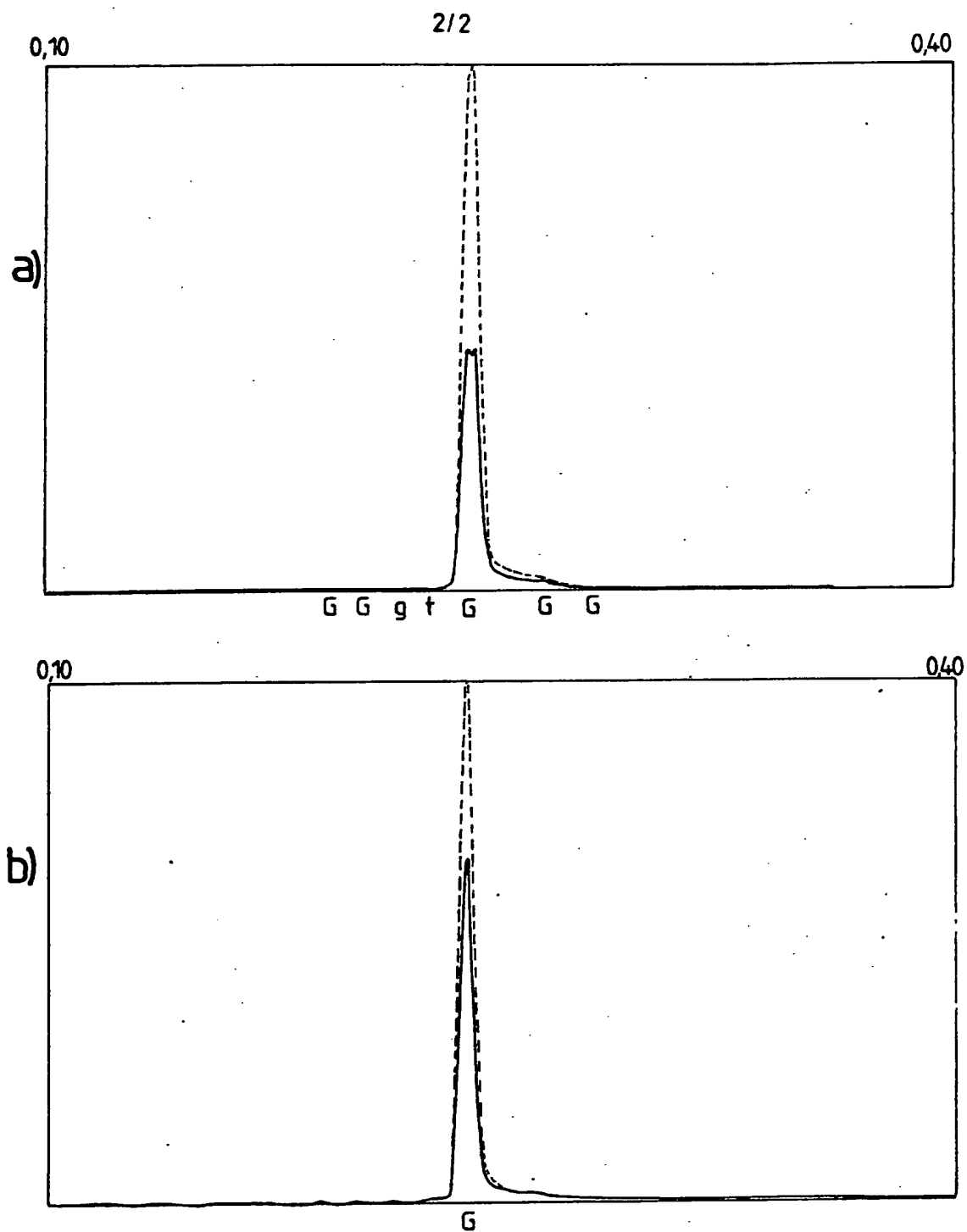
10 12') Kit ou coffret selon l'une quelconque des revendications 9 à 11, caractérisé en ce qu'il comprend, en outre, des réactifs appropriés pour le dosage du pyrophosphate.

15 13') Application du procédé selon l'une quelconque des revendications 1 à 8, à la détection de la présence de séquences d'acides nucléiques particulières associées à des maladies, telles que maladies génétiques ou maladies cancéreuses, à des infections, ou propres à permettre l'identification d'individus humains, animaux ou végétaux.

20

1/2

FIG.1

FIG. 2